

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18107007

研究課題名（和文） 古代中国人類集団の遺伝的多様性とその変遷ならびに生活史の解明

研究課題名（英文） Ancient Chinese: their Genetic Diversity and Life History

研究代表者

植田 信太郎 (UEDA SHINTAROH)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：20143357

研究成果の概要（和文）：

2500年前から2000年前にかけて古代中国の人類集団の遺伝的構成が大きく変化したことを示した我々の先の研究成果を発展させるため、黄河中流（中原）の3000年前ならびに3500年前の遺跡から出土した古人骨のDNA分析をおこなった。その結果、（1）3500年前から3000年前にかけても変化が起きていたこと、（2）3500年前と現在の人類集団の遺伝的多様性には違いがみられないこと、が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

To explore further our previous findings that drastic spatio-temporal changes in the genetic structure of Chinese people had occurred during the past 2,500 years, we analyzed ancient DNA of human remains excavated from the 3,000- and 3,500-year-old sites in the Central Plain of China. We obtained the following results: (1) drastic spatio-temporal changes had occurred also between 3,500 and 3,000 years ago, and (2) the population of 3,500 years ago showed a genetic similarity with present-day Han Chinese.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	20,500,000	6,150,000	26,650,000
2007年度	31,000,000	9,300,000	40,300,000
2008年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2010年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
総計	81,300,000	24,390,000	105,690,000

研究分野：分子人類学・分子進化学

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：古代DNA、古人骨、遺伝的多様性、中国、次世代シーケンサ

1. 研究開始当初の背景

人類集団の起源・系統を明らかにする上で周辺の人類集団の遺伝的特性を知ることは不可欠である。そこで、蛋白多型そしてDNA多型をもちいた集団遺伝学的解析によって、対象とする人類集団が居住する周辺地域の様々な人類集団の遺伝的多様性が明らかにされてきた。また、それらを指標として各人類集団間の遺伝的類縁性

（系統関係）が推定され、論じられてきた。しかし、現代人のデータだけをもって起源や系統を論ずることは、古代と現代の間に存在する時間を無視することになる。すなわち、集団の移動や拡散を無視し（過去に人の移動がなかったものと無理矢理に仮定し）、さらに、集団間の遺伝的混合すなわち混血もなかったものと見なすこととなり、非現実的な仮定の下での議論をおこ

なう脆弱性が生じる。

本研究課題研究代表者・植田らは、この15年あまりの間に、遺伝情報物質であるDNAを古代生物試料である古人骨試料から取り出し、精製し、増幅し、塩基配列を明らかにするための実験方法を開発し、古代生物試料を遺伝学的解析の直接の分析対象とすることを可能にしてきた。そして、日本・中国・東南アジアの様々な遺跡から出土した古人骨試料からのDNA分析に成功を収めてきた。特に、中国山東省の古代遺跡から出土した古人骨のDNA分析によって、以下の驚くべき研究成果を上げることになった。

中国・山東省・Linzi（春秋から戦国時代にかけての七雄の一つである斉の国の都があった場所）において、約2500年前の春秋時代ならびに約2000年前の漢代の遺跡から出土した古人骨試料ならびに現在同地に居住する漢民族集団の遺伝的多様性に関する解析、すなわち、同じ場所の異なる3つの時代の人類集団の遺伝的多様性の比較をおこない、2500年前の集団と他の2つの時代の集団との間の遺伝的多様性には統計学的に有意な差が観察され、2500年前から2000年前の500年間に人類集団の遺伝的構成に大きな変化が起きていたことを示した。集団間の遺伝的距離に基づく系統樹解析の結果、現代東アジア人類集団はそれらで一つのクラスタを形成し、現代ヨーロッパ人類集団もそれらで一つのクラスタを形成し、現代中央アジア人類集団は両クラスタの中間に位置し、現代人類集団の系統関係は現在のそれぞれの地理的分布を反映していた。ところが、2000年前の漢代の人類集団は現代東アジア人類集団クラスタの外側に（現代中央アジア人類集団と共に）位置し、さらに驚いたことに、2500年前の春秋時代の人類集団は現代ヨーロッパ人類集団と極めて近縁な関係を示していた。多次元尺度法による分析でも全く同じ結果が得られた。これにより、現代ヨーロッパ人類集団と遺伝的に近縁な人類集団が今から2500年前にはユーラシア大陸東端の黄河河口域に存在していたこと、2500～2000年前の間に現在の東アジア系の人類集団が移住し、移住してきた現在の東アジア系の人類集団に

吸収される形で両集団の間で融合が起きていたこと、が示された。

2. 研究の目的

本研究では我々自身によって得られた上述の研究成果を一段と発展させることを主たる目的とし、

- (1) “現代ヨーロッパ人類集団と遺伝的に近縁な人類集団”がいつ頃、黄河中下流に移動してきたのかを明らかにすることを目的とした黄河中流（中原）を中心とした様々な遺跡から出土した古人骨のDNA分析により、古代中国人類集団の遺伝的多様性とその変遷を明らかにする。
- (2) 古代中国の様々な遺跡から出土した古人骨の病理学的、法医学的な分析により、古代中国の人々の“病や死”を明らかにする。
- (3) 古代中国の遺跡から出土した動植物遺骸とくに主要な穀物であるコメの遺骸である炭化米のDNA分析をおこなうことにより、古代中国の人々の生活を支えた主要穀物の様態を明らかにする。

以上の解析によって、世界を代表する古代文明の一つである黄河文明を担った人々の遺伝的多様性とその時代的変遷、人々の生活を支えていた食べ物、また、人々を取り巻いていた環境を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、2500年前（春秋時代）より古い時代の古代中国における人類集団の遺伝的構成は2000年前（漢代）以降と大きく異なっていることを示した、我々自身による以上の研究成果を一段と発展させることを大きな目的とし、

- (1) “現代ヨーロッパ人類集団と遺伝的に近縁な人類集団”がいつ頃、黄河流域に移動してきたのかを明らかにする。このために、これまでの研究で分析してきた遺跡の年代よりも古く、かつ、黄河中流域（中原）を中心とした様々な遺跡から出土した古人骨のDNA分析をおこない古代中国人類集団の遺伝的多様性とその変遷を明らかにする。
- (2) 古代中国の人々の“病や死”を明らかにする。このために、黄河中下流域を中心とした様々な遺跡から出土した古人骨の病理

学的、法医学的な分析をおこなう。ここでの分析は骨形態あるいは骨に残されたマクロ的な痕跡の分析に加えて、金属元素分析というミクロ的分析もおこなう。本研究対象の時代の一つである商代は青銅器によって特徴づけられている。古人骨に残された金属汚染の有無を探ることは、時代を象徴する青銅器に由来する“汚染”の人類史を明らかにすることでもある。

(3) 古代中国の人々の生活を支えた動植物の様態を明らかにする。このために、黄河中下流域を中心とした様々な遺跡から出土した動植物遺骸とくに主要な穀物であるコメの遺骸である炭化米のDNA分析をおこなう。主要な食料である穀類とヒトとの係わり合いを、遺跡から出土した炭化植物の遺伝的多様性から明らかにする。すなわち、炭化植物のDNA分析によって種の同定をおこなう。これにより、古代の人々がどのような植物を食料としていたのかを明らかにすると共に、遺伝的多様性を指標として穀類の栽培化と品種改良についての考察をおこなう。また、黄河中下流域を中心とした様々な遺跡から出土した古人骨からコラーゲンを抽出し、炭素ならびに窒素の元素分析をおこなう。以上の分析を通じて、古代中国におけるヒトと動植物との係わりを明らかにしていく。

4. 研究成果

2500年前より古い時代の古代中国における人類集団の遺伝的構成は2000年前(漢代)以降と大きく異なっていることを示した我々自身による研究成果を一段と発展させるにあたって、まず、本研究計画の緒となった2500年前(春秋時代)の山東省遺跡から出土した古人骨のDNAを分析する領域を先の研究の約2倍の領域にまで拡大を図った。これは、比較する塩基配列長を増やす、すなわち、情報量を2倍に増やし、先の研究結果の再現性を確認すると共に、確たるものとするためである。この新たに設定した複数の領域に関しても塩基配列情報の取得に成功した。数理解析では、これまで用いてきた塩基多様度に基づく系統樹解析方法ならびに主成分分析法の一つである多次元尺度法に加えて、出土古人骨個々の(個体の)ハプログループタイピングも並行しておこない、集団特異的なハプログループの出現ならびにそれらの頻度を比較する分析もおこ

なった。その結果、先の研究結果である「2500年前から2000年前の500年間に中国・黄河河口域の人類集団の遺伝的構成に大きな変化、すなわち過去に大きな人類集団の移動が起きていたこと」に加えて、従来の常識を覆す「現代ヨーロッパ人類集団と遺伝的に近縁な人類集団が今から2500年前にはユーラシア大陸東端の黄河河口域に存在していた」との驚くべき結果の再現性が、系統樹解析方法ならびに多次元尺度法による分析から確認されただけでなく、集団特異的なハプログループの出現ならびにそれらの頻度の観点からも明確に支持された。

この結果は、2500～2000年前の間に現在の東アジア系の人類集団が移住してきたこと、そして移住してきた現在の東アジア系の人類集団に吸収される形で両集団の間で融合が起きていたこと、を意味する。そこで、他の古代中国人類集団の遺伝的多様性とその時代的変遷を明らかにすることを目的として、古人骨DNA分析に必要な遺跡出土古人骨の収集を複数の遺跡に関して実施した。調査対象は中原とした。黄河中流域に位置する中原は、古代中国における政治・経済・文化の中心地であることが理由である。3000年前の河南省商代晩期の代表的遺跡、同じく河南省の3500年前の商代前期の代表的遺跡から、DNA分析に必要な量の出土古人骨と、集団としての比較解析に必要な出土古人骨の数の両方で十分な古人骨試料の収集に成功した。これら新たな収集に成功した古人骨試料のうち、3000年前の河南省商代晩期の遺跡から出土した古人骨に関しては、2500年前の遺跡から出土した古人骨と同様に、2倍に拡大したDNA領域を分析した。その結果、塩基多様度に基づく系統樹解析方法ならびに多次元尺度法、そして出土古人骨個々のハプログループタイピング分析(集団特異的なハプログループの出現ならびにそれらの頻度分析)のすべてにおいて、3000年前の河南省商代晩期の遺跡人類集団は先の2500年前の山東省春秋時代遺跡人類集団と系統的に近く、古代中国の政治・経済・文化の中心地である中原に位置する人類集団も現在東アジアに分布している人類集団とは異なった遺伝的多様性からなる集団であったことが示された。ハプログループタイピング分析は、特定の集団にしか見られないハプログループが存在する場

合あるいはハプログループの出現頻度が特定の集団に限定されている場合には有効性の高い分析方法であることが知られている。そこで、3500年前の河南省商代前期の遺跡から出土した古人骨試料については、主にハプログループタイピングにより分析をおこなった。その結果、現在の東アジア集団に特徴的なハプログループが多くを占めることが明らかとなった。これは、本研究の目的である古代中国とくに古代中国の政治・経済・文化の中心であった中原における人類集団の遺伝的多様性の時代的変遷に関して重要な意味をもつ知見である。すなわち、(1) 3500年前から3000年前にかけて人類集団の遺伝的多様性の変化が起きた後、2500年前から2000年前に再び人類集団の遺伝的多様性の変化が生じたこと、(2) 3500年前と2000年前以降の人類集団の遺伝的多様性には大きな違いがみられないこと、を意味する。商の社会は氏族ごとの集落である邑が社会の基本単位であり、邑の集合体にすぎなかった。その後も、紀元前221年に秦の始皇帝によって統一国家が初めて築かれるまでは、王朝は権力ではなく權威の象徴としての意味が高かったとされている。したがって、上記の結果は古代中国中原地域全体としての人類集団の遺伝的多様性の変遷とみるのか、(今回対象とした遺跡は時代を代表する遺跡であるが) 特定の集団における結果とみるのか(すなわち、様々な遺伝的多様性をもつ人類集団によって構成されていた複合社会とみるのか)、2つの可能性が示された。この問題に対する解は、同時代ながら地理的に離れた様々な遺跡から出土した古人骨の解析によって得られる。本研究を今後も発展させていく必要がある。次に、古人骨に残された病変あるいは法医学的死因について肉眼的検証、ならびに、3500～3000年前の商代に登場した青銅器の使用による人体への影響を探るために金属元素分析を実施し、古代中国の人々の“病や死”を探った。DNA分析をおこなう全ての出土古人骨を対象に、病変あるいは法医学的死因について肉眼的検証をおこなったが、時代や集団に固有の特徴は見られなかった。一方、金属元素分析によって、3000年前の河南省商代晩期の遺跡から出土した古人骨から、通常では骨成分に含まれていないか超微量しか含まれていないはずの元

素が過量に存在している元素を複数、しかも複数個体(古人骨)で検出した。これが青銅器の使用による人体への影響の結果であるのか、あるいは他の原因が考えられるのかの検討をおこなったが、明確な結論を得るに至っていない。

次に、古代中国の人々の生活を支えた動植物の一つであるコメの遺骸である「遺跡から出土した炭化米」のDNA分析をおこなった。炭化米DNA分析の先行研究ではPS-1D領域と呼ばれる葉緑体の特定領域の中の繰り返し配列の構成だけを用いて数多くの議論が進められてきた。しかし、本課題の予備的解析によって、繰り返し配列は東アジアにおける食用米である *Oryza sativa* の亜種分類等の指標としては不相当であることを明らかにしていた。本研究では *Oryza* 属に属する20種47コレクションの葉緑体ゲノム情報解析により、*Oryza sativa japonica*, *O. s. indica*, *Oryza nivara* の分子系統分析に有用な、遺伝的多様性に富むと同時に各系統に独立な変異部位であるインフォーマティブ・サイトを抽出した。これらインフォーマティブ・サイトの有用性を検証することを目的として日本の弥生時代ならびに古墳時代の遺跡から出土した炭化米を用いた分析によって、日本で栽培されていたコメは単一亜種 *Oryza sativa* だけではないとの結果が得られた。そこで古代中国出土の炭化米を分析したが、分析に成功した炭化米はいずれも *Oryza sativa* であった。これにより、今後数多くの炭化米試料を分析する機会を得ることによって古代中国で栽培されていたコメの多様性を解明するための原理・手法の確立に成功した。また、2500年前の出土古人骨からコラーゲンを抽出し、炭素ならびに窒素の元素分析をおこなった。個体(古人骨)ごとに炭素ならびに窒素の同位体比のプロット相対位置はかなり異なっており、集団としての特徴を抽出することは困難であった。古人骨が出土した遺跡は現在の海岸線より100kmほど内陸に位置しているが、文献によれば当時は黄河の河口付近に位置していたと考えられる。したがって、当時の人々の食性は多様であると共に、均一でない(個人差がかなり大きい)と考えられた。この食性の違いが各個体の社会的地位・身分との間に相関があるのかどうかは興味深い、副葬品から判断する限り各個体(各古人骨)の社

会的身分に大きな差は存在しておらず、またDNAタイプとの関連もみられなかった。古人骨から得られるDNAは超微量かつ断片化されているため、これまでの古人骨DNA研究では、(1)短いDNA領域をPCR法により増幅し、(2)増幅に成功したDNAの塩基配列を決定する。(3)同様の実験を他のDNA領域に関しておこない、多くの塩基配列情報を得る、という極めて非効率な(多大な時間と労力を必要とする)実験に依存してきた。特に問題となるのは、PCR増幅の効率がDNA領域ごとに異なるため、得られた古人骨DNA塩基配列を古人骨間で整列させると虫食い状になる。このため、個体数を必要とする集団解析では共通最大長の配列データを用いることとなるため、ただでさえ短い配列データを短くして次の分析ステップである数理解析を実施せざるを得なかった。この問題を解決することを目的とし、本研究では次世代シーケンサをもちいた古人骨DNA分析に挑戦した。大多数の古人骨は土中から取り出されるため、現代人と同じ実験操作をおこなったのでは次世代シーケンサによって得られる塩基配列の99%以上は土中のバクテリア由来の配列である。そこで、合成RNAをベイト配列とした液相でのターゲット・キャプチャーにより、目的とする古人骨由来のDNAの選択的分離を試みた。その結果、ターゲットとしたミトコンドリアDNAの約80%の領域を平均5以上のカバレッジとなるユニークリードを得、古人骨DNA分析の問題点を劇的に改善することに成功した。さらに、従来の塩基配列決定法であるサンガー法と比較して得られる塩基配列の精度が劣る次世代シーケンサの欠点で補うためにユニークリードを効率よく得るための様々な方策を施し、現代人のDNA分析と同じ精度で古人骨の塩基配列を得ることを可能にした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計39件:すべて査読あり)

(a/A) a:掲載されている順番、A:総員数

- (1) K. Koganebuchi et al. (6/7), Autosomal and Y-chromosomal STR markers reveal a close relationship between Hokkaido Ainu and Ryukyu islanders. *Anthropol Sci* (in press)
- (2) J-H. Park et al. (10/15), Effects of an Asian-specific nonsynonymous EDAR variant on multiple dental traits. *J Hum Genet* (in press)
- (3) J. Gojobori and S. Ueda, Elevated evolutionary rate in genes with homopolymeric

amino acid repeats constituting non-disordered structure. *Mol Biol Evol* 28: 543-550 (2011)

(4) C. Hasegawa et al. (7/7), Determination of dextromethorphan in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 401: 2215-2223 (2011)

(5) M. Kumagai, L. Wang, and S. Ueda, Genetic diversity and evolutionary relationships in genus *Oryza* revealed by using highly variable regions of chloroplast DNA. *Gene* 462: 44-51 (2010)

(6) H. Matsukusa, H. Oota, K. Haneji, T. Toma, S. Kawamura, and H. Ishida, A Genetic Analysis of the Sakishima Islanders Reveals No Relationship with Taiwan Aborigines but Shared Ancestry with Ainu and Main-island Japanese. *American Journal of Physical Anthropology* 142:211-23 (2010)

(7) S. Nakagome et al. (7/7), Population-specific susceptibility to Crohn's disease and ulcerative colitis; dominant and recessive relative risks in the Japanese population. *Ann Hum Genet* 74:126-36 (2010)

(8) T. Kurosaki, T. Matsuura, K. Ohno, and S. Ueda, Alu-mediated acquisition of unstable ATTCT pentanucleotide repeats in the human ATXN10 gene. *Mol Biol Evol* 26: 2573-2579 (2009)

(9) N. Miyano-Kurosaki et al. (3/8), Anticancer effects of phenoxazine derivatives revealed by inhibition of cell growth and viability, dysregulation of cell cycle, and apoptosis induction in HTLV-1-positive leukemia cells. *J Pharmacol Sci*, 110: 87-97 (2009)

(10) H.R. Luo et al. (5/7), Origin and dispersal of atypical aldehyde dehydrogenase ALDH2487Lys. *Gene* 435: 96-103 (2009)

(11) R. Kimura et al. (13/13), A common variation in EDAR is a genetic determinant of shovel-shaped incisors. *American Journal of Human Genetics* 85: 528-535 (2009)

(12) T. Kurosaki, T. Matsuura, K. Ohno, and S. Ueda, Long-range PCR for the diagnosis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurogenetics* 9: 151-152 (2008)

(13) Y. Kumamoto et al. (4/8), Temporal and spatial variations of radiocarbon in Japan Sea Bottom Water. *Journal of Oceanography* 64, 429-441 (2008)

- (14) J. Sawada, T. Suzuki, M. Yoneda, M. Sat, K. Hirata, and Y. Dodo, Severe developmental defects of enamel in a human skeleton of the Final Jomon age from the Nakazawahama shell-mound, Iwate, Japan. *Anthropological Science* 116, 105-121 (2008)
- (15) K. Irei et al. (6/7), Dental diseases of human skeletal remains from the early-modern period of Kumejima island, Okinawa, Japan. *Anthropological Science* 116(2), 149-159 (2008)
- (16) Y. Kato et al. (6/7), Determination of $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ of acetaldehyde in indoor air by compound specific radiocarbon analysis. *Atmospheric Environment* 42, 1049-1056 (2008)
- (17) N. Anan et al. (7/7), Morphological Change Caused by Loss of the Taxon-Specific Polyalanine Tract in Hoxd-13. *Mol Biol Evol* 24: 281-287 (2007)
- (18) H. Oota et al. (1/7), Conservative evolution in duplicated genes of the primate Class I ADH cluster. *Gene* 392: 64-76 (2007)
- (19) Y. Han et al. (3/8), Evidence of positive selection on a Class I ADH locus. *American Journal of Human Genetics* 80: 441-456 (2007)
- (20) M. Yoneda et al. (1/9), Radiocarbon marine reservoir ages in the western Pacific estimated by pre-bomb molluscan shells. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 259, 432-437 (2007)
- (21) T. Kurosaki, A. Ninokata, L. Wang, and S. Ueda, Evolutionary scenario for acquisition of CAG repeats in human SCA1 gene. *Gene* 373: 23-27 (2006)
- (22) M. Terada, T. Shinozuka, E. Tanaka, K. Honda, and K. Kurosaki, Rapid and simple analysis of oxazolobenzodiazepine drugs in sera by wide-bore capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection using on-column methylation. *Forensic Toxicol*, 24: 58-64 (2006)

[学会発表] (計 153 件)

- (1) M. Kumagai, L. Wang, and S. Ueda, Construction of rice chloroplast DNA reference data and its application for ancient DNA analysis of over 2,000 years old rice seed remains. The Society for Molecular Biology and Evolution, Annual Meeting (Jul. 26 - 30, 2011 Kyoto, Japan)
- (2) H. Oota, How should we think of "population" in population genetics? A

Japan-based Global Study of Racial Representation International Workshop. The Interface of Humanities and Genomics (Jan. 22 - 23, 2011 Kyoto, Japan)

- (3) M. Kumagai, L. Wang, and S. Ueda, Evolutionarily informative sites in the chloroplast genome of rice and their application to the phylogeny of *Oryza* species. International symposium on wild rice 2009 (November 22-24, 2009, Bangkok, Thailand)

[図書] (計 8 件)

- (1) 熊谷真彦、植田信太郎 「イネの遺伝的多様性 DNA 分析による研究」、考古学を科学する、pp 99 - 113、2011、臨川書店 ISBN 9784653040484
- (2) H. Oota, and M. Stoneking, Effects of Human Migration on Genome Diversity in East Asia. pp 173 - 187. *Racial Representations in Asia*, edited by Prof. Yasuko Takezawa (2011) Kyoto University Press (Kyoto, Japan) and Trans Pacific Press (Melbourne, Australia) ISBN 9781920901585
- (3) 植田信太郎 「古代DNA」、進化学・第2巻：遺伝子とゲノムの進化、pp 219 - 238、2006、岩波書店

[その他]

ホームページ

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/shinka/lab.html>

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/aDNA/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 信太郎 (UEDA SHINTAROH)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：20143357

(2) 研究分担者

黒崎 久仁彦 (KUROSAKI KUNIHICO)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：60240701

太田 博樹 (OTA HIROKI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：40401228

米田 穰 (YONEDA MINORU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：30280712

(H18→19：研究分担者)